云 南 植 物 研 究 2010，32(2)：141～146
Acta Botanica Yunnanica DOI：10.3724/SP.J.1143.2010.09239

拟南芥 *SDIR1* 基因转录的选择性剪接*

武晓璐，汤晓倩，于丽霞，姚有林，鄢 波**
（西南林学院园林学院，云南 昆明 650224）

摘要：采用 PCR 及 RT-PCR 法分别克隆了拟南芥 *SDIR1* 基因的 DNA 和 cDNA 序列。根据序列比对分析结果，发现了 3 种不同的转录本，提示 *SDIR1* 基因的转录中存在选择性剪接。3 种转录本的长度分别为 822 bp、691 bp 和 666 bp，依次命名为：*SDIR1-822*、*SDIR1-691*、*SDIR1-666*。与 *SDIR1* 基因的 DNA 序列及已报道的 *SDIR1* cDNA 序列比较，除转录本 *SDIR1-822* 包含了完整的编码序列外，其余 2 种转录本的编码序列都存在不同长度的缺失。其中，*SDIR1-691* 缺失了 131 bp 的片段：第 2 外显子 3′端缺失 33 bp，第 3 外显子 53 bp 全部缺失，第 4 外显子 5′端缺失 45 bp；转录本 *SDIR1-666* 缺失了 156 bp 的片段：第 3 外显子 3′端缺失 18 bp，第 4 外显子 5′端缺失 138 bp。进而随机挑取 101 个克隆子对三种转录本的表达比例进行初步分析，结果表明 3 种分子的比值为 *SDIR1-822*：*SDIR1-691*：*SDIR1-666* = 26.00：1.33：1.00，反映出 *SDIR1* 基因不同转录本在拟南芥中的相对表达量。

关键词：*SDIR1* 基因；选择性剪接；拟南芥
中图分类号：Q 78 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2700(2010)02-141-06

Alternative Splicing of *SDIR1* Gene in *Arabidopsis thaliana* (Cruciferae)

WU Xiao-Lu，TANG Xiao-Qian，YU Li-Xia，YAO You-Lin，YAN Bo**
（*Faculty of Landscape Architecture; Southwest Forestry College*，Kunming 650224，China）

Abstract：Sequences of DNA and cDNA of *SDIR1* gene in *Arabidopsis thaliana* were isolated by using PCR and RT-PCR. The alignment result showed that there were three different transcripts in *Arabidopsis thaliana*, which indicated that there were alternative splicing pneumonia in the transcription of *SDIR1* gene. The length of three transcripts were 822 bp，691 bp and 666 bp，respectively，and were named as *SDIR1-822*，*SDIR1-691* and *SDIR1-666* subsequently. Compared with the reported sequences of DNA and cDNA in *Arabidopsis thaliana*，*SDIR1-822* contained intact coding domain，while the others missed some nucleotides in coding domain. *SDIR1-691* missed 131 bp which contained 33 bp in the 3′ end of the second exon，53 bp of all the third exon and 45 bp in the 5′ end of the fourth exon. *SDIR1-666* missed 156 bp which contained 18 bp in the 3′ end of the third exon and 138 bp in the 5′ end of the fourth exon. The expression ratio of three different transcripts *SDIR1-822*, *SDIR1-691* and *SDIR1-666* was 26.00：1.33：1.00 analyzed by selecting 101 clones，which might indicate the relative content of different transcripts of *SDIR1* gene in *Arabidopsis thaliana*.

Key words：SDIR1 gene；Alternative splicing；*Arabidopsis thaliana*

SDIR1（SALT-AND DROUGHT-INDUCED RING FINGER1），具有环指结构域的 E3 泛素蛋

* 基金项目：西南林学院人才引进启动项目、省部级重点学科、省高校重点实验室及校实验室共享平台资助项目
** 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：yanbodr@yahoo.com.cn
收稿日期：2009-11-30，2009-12-22 接受发表
作者简介：武晓璐（1985－）女，西南林学院园林植物与观赏园艺在读硕士研究生，从事植物分子生物学研究。
E-mail：huaxiaosheng1985@gmail.com

白连接酶，可以正向调控拟南芥胁迫响应的脱落酸传导途径（Zhang 等，2008）。*SDIR1* 在拟南芥受到干旱和盐害胁迫时可以表达，但不受ABA（Abscisic Acid）诱导。有试验证明对拟南芥干旱处理0～48 h，*SDIR1* 的表达增强，且在植株各部位均有表达（Zhang 等，2007）。

选择性剪接是细胞生物体产生复杂蛋白的一个重要机制，最重要的功能是可提高基因产物的多样性和基因表达的复杂程度。拟南芥基因组中绝大多数发生选择性剪接的基因编码的蛋白都与调控功能有关（Anireddy，2007）。植物前体mRNA 选择性剪接，最早是 Werneke 等（1989）研究发现 *RCA* 基因在菠菜和拟南芥的叶片中均可发生选择性剪接。生物信息学研究表明，4%的大麦基因（Zhang 等，2004）、11.6%的拟南芥基因（Iida 等，2004）和10%的水稻基因发生了选择性剪接（Kikuchi 等，2005），并且在水稻中检测到大量基因在第一外显子发生选择性剪接（Kitagawa 等，2005）。除了核基因组的基因外，线粒体（Wang and Brendel，2006）和叶绿体（Barbazuk 等，2008）的基因也会发生选择性剪接。本文在对 *SDIR1* 基因的克隆研究中也首次发现该基因存在选择性剪接现象。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥 *Arabidopsis thaliana*（L.）Heynh，Columbia 生态亚型，由中科院昆明植物研究所惠赠。大肠杆菌 DH5α 由本实验室提供。

1.2 拟南芥总 RNA、DNA 的提取

选取新鲜拟南芥植株分别采用 TIANGEN 公司的 TRIzol 植物总 RNA 提取试剂盒和 TaRaKa 公司植物基因组 DNA 提取试剂盒提取拟南芥总 RNA、DNA。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测提取总 RNA、DNA 纯度。

1.3 拟南芥 *SDIR1* 基因 cDNA 第一链合成

采用20 μl 反应体系。0.5 ml Eppendof 管加入13.5 μl RNA、oligo（dT）10（2 μg·μl^{-1}）0.5 μl、5×first strand buffer 4 μl、RNase Inhibitor（30 u·μl^{-1}）0.5 μl、M-MLV RTase（30 u·μl^{-1}）0.5 μl、dNTPs（2.5 mmol·L^{-1}）1 μl。42℃孵育60 min，置于－20℃备用。

1.4 PCR 扩增

1.4.1 引物序列如下：

SDIR1 Reverse primer

5—3：TCAAACCATGTCGGAAGCATCATC

SDIR1 Forward primer

5—3：ATGAGCTTTGTTTTCCGGGGAAG

引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.4.2 PCR 循环数的确定 以上述合成的 *SDIR1* cDNA 第一链为模板，进行 PCR 扩增，采用25 μl 反应体系：10×Taq DNA polymerase buffer 2.5 μl、Mg^{2+}（25 mmol·L^{-1}）1.5 μl、dNTPs（2.5 mmol·L^{-1}）2.0 μl、SDIR1 PF（12.5 pm·μl^{-1}）0.5 μl、SDIR1 PR（12.5 pm·μl^{-1}）0.5 μl、cDNA 第一链反应液1.0 μl、Taq DNA polymerase（5 u·μl^{-1}）（TIANGEN 公司）0.2 μl、ddH_2O 16.8 μl。反应条件为预变性94℃，4 min；循环参数为94℃ 30 s；60℃ 30 s；72℃ 90 s；分别在18，20，22，24，26，28，30，32，34，36，38，40，42，44，46个循环时进行扩增。反应结束后 PCR 产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测以确定适合的循环数。

1.4.3 PCR 扩增 分别以上述合成的 *SDIR1* cDNA 第一链、*SDIR1* DNA 为模板，进行 PCR 扩增目的片段，反应体系及参数如前。PCR 产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 序列分析

PCR 扩增产物经胶回收试剂盒（尚能生物科技）纯化后，采用 TaKaRa 公司的 pMD18-T 载体进行克隆，宿主菌为大肠杆菌 DH5α。挑取克隆子经 PCR 鉴定，选择部分不同片段长度的克隆子送 TIANGEN 测序。

1.6 差异表达研究

挑取101个克隆子，经 PCR 鉴定和1%琼脂糖凝胶电泳，统计含有不同片段长度的克隆子数，从而计算 *SDIR1* 基因不同转录本的比例。

2 结果与分析

2.1 PCR 循环数的确定

本研究分别进行18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46个循环的 PCR 扩增，1%琼脂糖凝胶电泳检测，预期大小的目的片段在38个循环前明显处于线性扩增期。我们选定 *SDIR1* cDNA 的 PCR 扩增循环数为38个循环。

2.2 *SDIR1* cDNA PCR 扩增

利用前述合成的 *SDIR1* 基因 cDNA 第一链为模板，用 *SDIR1* Primers 进行 PCR 扩增目的片段，RT-PCR 反应产物电泳结果见图1。在大约822 bp 的位置有一条明亮的扩增带，并在其下方约600 bp 左右还可见一条很微弱的扩增带，将这两条带所在区域经胶回收试剂盒纯化后，用于后续的序列分析。

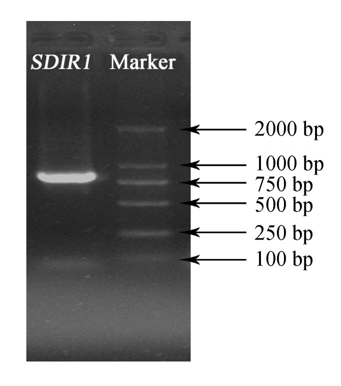


图 1　*SDIR1* PCR 扩增

M：DNA 标准分子量 2000

Fig. 1　Amplification of *SDIR1* cDNA

M：DNA marker 2000

2.3　*SDIR1* DNA PCR 扩增

利用 *SDIR1* DNA 为模板，用 *SDIR1* Primers 进行 PCR 扩增目的片段，电泳检测结果见图 2，在大约 1.8 kb 的位置有一条特异扩增带，切下，经胶回收试剂盒纯化后，进行克隆。

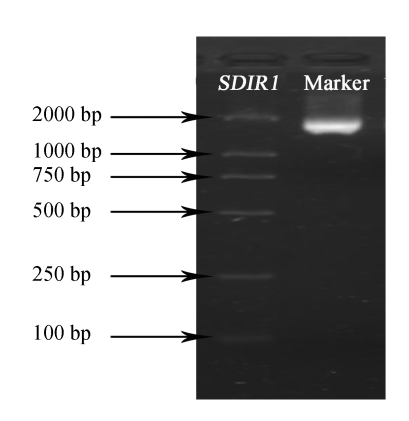


图 2　*SDIR1* DNA PCR 扩增

M：DNA 标准分子量 2000

Fig. 2　Amplification of *SDIR1* DNA

M：DNA marker 2000

2.4　菌落 PCR 检测

cDNA 检测：利用 *SDIR1* primers 对获得的克隆子进行了 PCR 鉴定，结果出现 3 种不同大小的分子(图 3)，其大小分别约为 822 bp、691 bp、699 bp。

DNA 检测：利用 *SDIR1* primers 对获得的克隆子进行了 PCR 鉴定，在大约 1.8 kb 位置有一条特异扩增带。

2.5　克隆子测序结果

克隆子测序结果显示，来源于 cDNA 的 PCR 扩增产物的克隆子中发现下列 3 种分子：大小分别为 822 bp、691 bp、666 bp。与已报道的 *SDIR1* cDNA（GenBank NM_115410）比对发现，822 bp 片段包含了完整的编码序列；691 bp 片段则比该片段少了 131 bp；666 bp 片段则是少了 156 bp（图 4）。其余序列与已报道的 *SDIR1* cDNA 序列完全一致。根据序列的不同，将三个转录本命名为 *SDIR1-822*、*SDIR1-691*、*SDIR1-666*。

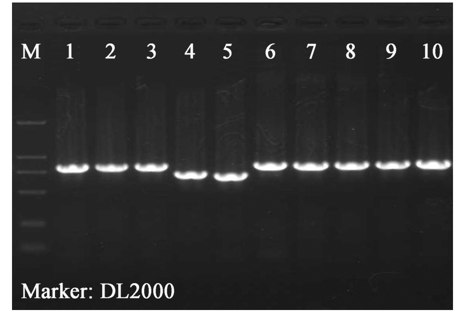


图 3　部分克隆子菌落的 PCR 鉴定

M：DNA 标准分子量 2000；

1～10：随机挑选克隆子的菌落 PCR 鉴定

Fig. 3　Identification of part clones by PCR

M：DNA marker 2000；

1～10：Identification of part clones by PCR

同时，来源于 DNA 的 PCR 扩增产物的序列测序结果与已报道的 *SDIR1* 基因的 DNA 序列具有 100% 同源性。结合已报道的 *SDIR1* cDNA（GenBank NM_115410）序列，其外显子与内含子的位置结构如图 5 所示。

3 种选择性剪接转录本的序列特征如下：

转录本 *SDIR1-822* 包含完整的编码序列。

转录本 *SDIR1-691* 缺失了 131 bp 的片段：第二外显子 3′端缺失 33 bp，第三外显子 53 bp 全部缺失，第四外显子 5′端缺失 45 bp，使其产生的成熟的 mRNA 缺失了三段外显子。此缺失导致了移框突变的发生，并导致了终止密码子的提前出现，其结果是可能产生无功能意义的蛋白质片断。

转录本 *SDIR1-666* 缺失了 156 bp 的片段：第三外显子 3′端缺失 18 bp，第四外显子 5′端缺失 138 bp，使其产生的成熟的 mRNA 缺失了两段外显子。此缺失导致了 *SDIR1* 蛋白质中缺失了一段连续的氨基酸序列：MPPNFLLWLVLGVFLMATTLAQAAAASGLFSHTELRLH，包含 52 个氨基酸残基。据报道 SDIR1 蛋白质中有一段高度保守的环指结构域和两段跨膜结构域，且

其功能与胞内膜系统相关（Zhang 等，2008）。该转录本编码的蛋白质仍含有完整的环指结构域和第一个跨膜结构域，但缺失了第二个跨膜结构域，这对于该蛋白与细胞内膜结合的影响，乃至对其功能的影响如何，尚待进一步的研究。

结合已有资料和报道，我们推断 *SDIR1* 基因可能是由于前体 mRNA 的选择性剪接产生了上述差异。选择性剪接是真核细胞一种重要的 mRNA 转录后加工机制，由此而产生相应的多种 mRNA 异构体（Schmucker 等，2000），使一个基因可以翻译为多种多肽序列，是基因表达多样性的重要表现形式。据报道，在植物中，由于选择性剪接所生成的产物具有信号传导、免疫、发育、转运、抗病及调控等功能（Garcia-Ortiz 等，2004；

```
SDIR1-822  1   ATGAGCTTTGTTTTCCGGGGAAGTAGAGGAGATTTAGAAAGCGGATTCTCGGGTGGTTTTCTA 63
SDIR1-666  1   ATGAGCTTTGTTTTCCGGGGAAGTAGAGGAGATTTAGAAAGCGGATTCTCGGGTGGTTTTCTA 63
SDIR1-691  1   ATGAGCTTTGTTTTCCGGGGAAGTAGAGGAGATTTAGAAAGCGGATTCTCGGGTGGTTTTCTA 63
NM_115410  1   ATGAGCTTTGTTTTCCGGGGAAGTAGAGGAGATTTAGAAAGCGGATTCTCGGGTGGTTTTCTA 63

SDIR1-822  64  CCCGAAAGACGAGCTATGCGTGTTCATGGAGCTCGACCAGTTAATTCTAATTCCCTCGCTTTT 126
SDIR1-666  64  CCCGAAAGACGAGCTATGCGTGTTCATGGAGCTCGACCAGTTAATTCTAATTCCCTCGCTTTT 126
SDIR1-691  64  CCCGAAAGACGAGCTATGCGTGTTCATGGAGCTCGACCAG----------------------- 103
NM_115410  64  CCCGAAAGACGAGCTATGCGTGTTCATGGAGCTCGACCAGTTAATTCTAATTCCCTCGCTTTT 126

SDIR1-822  127 CTGGTTACAGTTCTTTTGCTGTTTATGATTCTCAATTCGCATCAGATGCCTCCTAATTTCCTG 189
SDIR1-666  127 CTGGTTACAGTTCTTTTGCTGTTTATGATTCTCAATTCGCATCAG------------------ 171
SDIR1-691  104 --------------------------------------------------------------- 103
NM_115410  127 CTGGTTACAGTTCTTTTGCTGTTTATGATTCTCAATTCGCATCAGATGCCTCCTAATTTCCTG 189

SDIR1-822  190 CTGTGGCTTGTGCTTGGGGTGTTTTTGATGGCAACGACGCTTAGGATGTATGCTACTTGCCAA 252
SDIR1-666  172 --------------------------------------------------------------- 171
SDIR1-691  104 ---------------------------------------------ATGTATGCTACTTGCCAA 121
NM_115410  190 CTGTGGCTTGTGCTTGGGGTGTTTTTGATGGCAACGACGCTTAGGATGTATGCTACTTGCCAA 252

SDIR1-822  253 CAACTTCAAGCTCATGCTCAGGCTCAGGCTGCAGCAGCAAGTGGCCTCTTTAGCCATACTGAG 315
SDIR1-666  172 --------------------------------------------------------------- 171
SDIR1-691  122 CAACTTCAAGCTCATGCTCAGGCTCAGGCTGCAGCAGCAAGTGGCCTCTTTAGCCATACTGAG 184
NM_115410  253 CAACTTCAAGCTCATGCTCAGGCTCAGGCTGCAGCAGCAAGTGGCCTCTTTAGCCATACTGAG 315

SDIR1-822  316 CTGAGGTTGCATGTGCCTCCTTCCATTGCTCTTGCTACGAGAGGGCGTCTTCAGGGACTTAGG 378
SDIR1-666  172 ------------GTGCCTCCTTCCATTGCTCTTGCTACGAGAGGGCGTCTTCAGGGACTTAGG 222
SDIR1-691  185 CTGAGGTTGCATGTGCCTCCTTCCATTGCTCTTGCTACGAGAGGGCGTCTTCAGGGACTTAGG 247
NM_115410  316 CTGAGGTTGCATGTGCCTCCTTCCATTGCTCTTGCTACGAGAGGGCGTCTTCAGGGACTTAGG 378

SDIR1-822  379 CTCCAGCTGGCTCTTCTTGATCGGGAATTTGATGACTTAGATTATGAAACTTTAAGAGCACTT 441
SDIR1-666  223 CTCCAGCTGGCTCTTCTTGATCGGGAATTTGATGACTTAGATTATGAAACTTTAAGAGCACTT 285
SDIR1-691  248 CTCCAGCTGGCTCTTCTTGATCGGGAATTTGATGACTTAGATTATGAAACTTTAAGAGCACTT 310
NM_115410  379 CTCCAGCTGGCTCTTCTTGATCGGGAATTTGATGACTTAGATTATGAAACTTTAAGAGCACTT 441

SDIR1-822  442 GATTCTGATAATGTTTCCACAACTTCTATGAGCGAGGAAGAGATAAATGCACTTCCAGTTCAC 504
SDIR1-666  286 GATTCTGATAATGTTTCCACAACTTCTATGAGCGAGGAAGAGATAAATGCACTTCCAGTTCAC 348
SDIR1-691  311 GATTCTGATAATGTTTCCACAACTTCTATGAGCGAGGAAGAGATAAATGCACTTCCAGTTCAC 373
NM_115410  442 GATTCTGATAATGTTTCCACAACTTCTATGAGCGAGGAAGAGATAAATGCACTTCCAGTTCAC 504

SDIR1-822  505 AAGTACAAGGTGTTGGATCCTGAAAATGGTTGCTCTTTGGCAAAGCAAGCGTCAACCTCATCC 567
SDIR1-666  349 AAGTACAAGGTGTTGGATCCTGAAAATGGTTGCTCTTTGGCAAAGCAAGCGTCAACCTCATCC 411
SDIR1-691  374 AAGTACAAGGTGTTGGATCCTGAAAATGGTTGCTCTTTGGCAAAGCAAGCGTCAACCTCATCC 436
NM_115410  505 AAGTACAAGGTGTTGGATCCTGAAAATGGTTGCTCTTTGGCAAAGCAAGCGTCAACCTCATCC 567

SDIR1-822  568 TCAGCTGAGAAGATGCTAGATTCTGCCAATGAAAGTAAAAAAGGAACAGAAGATGAGCTCACA 630
SDIR1-666  412 TCAGCTGAGAAGATGCTAGATTCTGCCAATGAAAGTAAAAAAGGAACAGAAGATGAGCTCACA 474
SDIR1-691  437 TCAGCTGAGAAGATGCTAGATTCTGCCAATGAAAGTAAAAAAGGAACAGAAGATGAGCTCACA 499
NM_115410  568 TCAGCTGAGAAGATGCTAGATTCTGCCAATGAAAGTAAAAAAGGAACAGAAGATGAGCTCACA 630

SDIR1-822  631 TGTAGTGTTTGCCTAGAACAAGTTACCGTAGGGGAAATCGTTCGCACCTTACCTTGTTTGCAT 693
SDIR1-666  475 TGTAGTGTTTGCCTAGAACAAGTTACCGTAGGGGAAATCGTTCGCACCTTACCTTGTTTGCAT 537
SDIR1-691  500 TGTAGTGTTTGCCTAGAACAAGTTACCGTAGGGGAAATCGTTCGCACCTTACCTTGTTTGCAT 562
NM_115410  631 TGTAGTGTTTGCCTAGAACAAGTTACCGTAGGGGAAATCGTTCGCACCTTACCTTGTTTGCAT 693

SDIR1-822  694 CAGTTTCATGCAGGATGTATCGATCCATGGTTGAGACAGCAAGGAACATGTCCTGTCTGTAAA 756
SDIR1-666  538 CAGTTTCATGCAGGATGTATCGATCCATGGTTGAGACAGCAAGGAACATGTCCTGTCTGTAAA 600
SDIR1-691  563 CAGTTTCATGCAGGATGTATCGATCCATGGTTGAGACAGCAAGGAACATGTCCTGTCTGTAAA 625
NM_115410  694 CAGTTTCATGCAGGATGTATCGATCCATGGTTGAGACAGCAAGGAACATGTCCTGTCTGTAAA 756

SDIR1-822  757 TTTAGAGCTCATTCAGGATGGCAAGAACAAGATGAGATTGATGATGATGCTTCCGACATGGTT 819
SDIR1-666  601 TTTAGAGCTCATTCAGGATGGCAAGAACAAGATGAGATTGATGATGATGCTTCCGACATGGTT 663
SDIR1-691  626 TTTAGAGCTCATTCAGGATGGCAAGAACAAGATGAGATTGATGATGATGCTTCCGACATGGTT 688
NM_115410  757 TTTAGAGCTCATTCAGGATGGCAAGAACAAGATGAGATTGATGATGATGCTTCCGACATGGTT 819

SDIR1-822  820 TGA 822
SDIR1-666  664 TGA 666
SDIR1-691  689 TGA 691
NM_115410  820 TGA 822
```

图 4　克隆的 *SDIR1* cDNA（822 bp，691 bp，666 bp）序列比对

NM_115410：已报道的 *SDIR1* 基因 cDNA 序列；SDIR1-822、SDIR1-691、SDIR1-666：*SDIR1* 基因 3 种分子大小分别为 822 bp、691 bp、666 bp

Fig. 4　Sequence alignment of *SDIR1* cDNA（822 bp，691 bp，666 bp）

cDNA sequence of reported *SDIR1* gene，the length of SDIR1-822，SDIR1-691 and SDIR1-666 was 822 bp，691 bp and 666 bp，respectively

ATGAGCTTTGTTTTCCGGGGAAGTAGAGGAGATTTAGAAAGCGGATTCTCGGGTGGTTTTCTACCCGAAAGACGAGCTATGGTATGCTTTCTTGAAAACAT
第一外显子
ATACAATGGTTTTTGTTAGAATGATACTTATTGCAAGTGTCTTTTGGTATCAGCGTGTTCATGGAGCTCGACCAGTTAATTCTAATTCCCTCGCTTTTCTGGT
第二
TACAGGTAAATTCAAACTTTCACCTTCTATGTTATCTTCAGTTGTGATGTTGTTAATACTTGTGTTTGGTTTGTGTATTTCAGTTCTTTTGCTGTTTATGATTC
外显子
TCAATTCGCATCAGATGCCTCCTAATTTCCTGGTATGATTAAATACGTGAGTTAAAGTTTTTTCCTTTTGAGTTAGTCGTCTTTCGGGTGTGAGTTTGACATT
第三外显子
TCCATTAATTTTGTAGCTGTGGCTTGTGCTTGGGGTGTTTTTGATGGCAACGACGCTTAGGATGTATGCTACTTGCCAACAACTTCAAGCTCATGCTCAGGCT
CAGGCTGCAGCAGCAAGTGGCCTCTTTAGCCATACTGAGCTGAGGTTGCATGTGCCTCCTTCCATTGCTCTTGCTACGAGAGGGCGTCTTCAGGGAC
TTAGGCTCCAGCTGGCTCTTCTTGATCGGGAATTTGATGACTTAGGTCAGTATCATCCGCTTGTTCCTTTTTATTAGTCTATAGTTTAGTAGTTTGCTTTCTA
第四外显子
TGGTTGAAGTCTGAGACAAAAGTTGTTCTGCTGCAACAGATTATGAAACTTTAAGAGCACTTGATTCTGATAATGTTTCCACAACTTCTATGAGCGAGGAAG
AGATAAATGCACTTCCAGTTCACAAGTACAAGGTGTTGGATCCTGAAAAGTGAGTCAATATTGTACCTTGTTTCTCTTTTAACAGTTTAAAATGCTTTCAAAT
第五外显子
GTGGAAACATTGAGGAATTAAGAAAATAGTAAGTTAGGATGATGTGATATAGCAACTTGTATAGACCTTAACTTCCTTAACAGGGGAAGGTGGGGTGGTAG
AATATACAACTTAATAAGTTAGAAACTGATATTGTACTTAGGTTTATTGTTTGCTTTGCTAAACGGAACATGTAAGGTATTGATTGTCCATTGAGTTACTAAA
GATTTGTTTTTCAATAGAATCTTCTAAAATCATGAGTTCCGTTGATCCCATCACTTCTTTGGTTAATCGTCAGGCGCTAGTTTTATTGTGGAATGAACATTTAA
AATTTGTTACTGAGTGAAACTTTTCTCAGTTTTCATAGCTCAACGCCTTTTTGTTTTCTTTCTAATTATTGTGAATGAATCTGTATTCATGGTTTTTGTCTTGCG
TTCGCTTTTGTTGACAGTGGTTGCTCTTTGGCAAAGCAAGCGTCAACCTCATCCTCAGCTGAGGTATATGACATATTTACATTTCCCCCCACCCCACAC
第六外显子
ACAAAAAAATAGCCGATATACAAAAATCACATTTGAACTGGTCAATACTCATATGCTCGGTAAAAAGTTCTTGCTAAGTGGCTAACAATGTCTTAATTTTTCA
TGTCGTTTTCCTCTTATTCAAAGCAGAAGATGCTAGATTCTGCCAATGAAAGTAAAAAAGGAACAGAAGATGAGCTCACATGTAGTGTTTGCCTAGAACAAG
TTACCGTAGGGGAAATCGTTCGCACCTTACCTTGTTTGCATCAGGTTTCCATTTTTACTTTTATCTTAAACTGAAAATCTTCCAGCTCTTTACTGTGTCACGA
第七外显子
CTCAGACATATATCCGTTTGCTCAGTTTCATGCAGGATGTATCGATCCATGGTTGAGACAGCAAGGAACATGTCCTGTCTGTAAATTTAGAGCTCATTCAGGA
TGGCAAGAACAAGATGAGATTGATGATGATGCTTCCGACATGGTTTGA
第八外显子

图 5　SDIR1 DNA 外显子与内含子的位置结构划线部分为外显子区域

Fig. 5　Localization of the exon and intron of SDIR1 lineation region is the exon

Hamada 等，2002；de la Fuente van Bentem 等，2003；Isshiki 等，2001；Li 等，2006)，有些选择性剪接基因编码的蛋白还与植物品质及开花时间有关（Reddy and Golovkin，2008)。转录本 *SDIR1-666* 在拟南芥的生长发育过程中，是独立作用还是协同作用，对其功能有何种影响还需要深入的研究。

2.6　*SDIR1* 基因选择性剪接转录本的差异表达研究

2.6.1　*SDIR1* 基因选择性剪接转录本的差异表达分析　　挑取 101 个克隆子，有阳性克隆子 85 个，其中 4 个克隆子含有 691 bp 长度的片段，3 个克隆子含有 666 bp 长度的片段，78 个克隆子含有 822 bp 长度的片段。3 种分子的相对表达比例 *SDIR1-822*∶*SDIR1-691*∶*SDIR1-666*＝26.00∶1.33∶1.00。该比值显示 *SDIR1* 基因不同转录本在拟南芥中的相对表达量。

SDIR1 基因在正常生长情况下具有一定的基础表达水平（Zhang 等，2007)。本实验取材于未经任何预处理的拟南芥新鲜植株，因此上述比值显示了 *SDIR1* 基因不同转录本在基础表达水平的相对表达量，同时也说明了该基因的选择性剪接现象在正常生长条件下就存在。但在干旱和盐诱导等逆境条件下该选择性剪接现象是否存在、表达量是否有变化以及可能的功能仍需进一步的研究。

2.6.2　选择性剪接转录本差异表达分析的可靠性　　RT-PCR 反应是酶促反应，遵循酶促反应定律（Bustin，2000)。其初期的循环数内扩增产物呈指数累积，产物与模板呈线性关系，定量 RT-PCR 技术正是利用产物与模板的这一线性关系，通过扩增产物来比较总 RNA 中目的基因表达丰度的不同（Gonzalez 等，2003)。但经过一定的循环后，PCR 产物不再呈指数累积而进入平台期，在平台期低水平表达的目的 RNA 可能会增加到与高水平表达的目的 RNA 相同的浓度（Morrison and Gannon，1994)，因此，为避免平台效应的影响，合适的循环数是 RT-PCR 用于定量分析的关键因素之一。

SDIR1 基因的 3 种不同转录本在 PCR 扩增中形成了一组天然的竞争性模板，即在同一 PCR 反应管中，三个模板竞争相同的引物、dNTPs 和聚合酶，形成了一种类似竞争性 PCR 反应的过程与

机制。因此，三种模板PCR最终产物的比值能够反映其初始状态时含量的比值。线性时期反应体系中的产物量也就代表了被检测模板的量（Gilliland等，1990；Zhang等，1997）。本研究中采用线性扩增期间的循环数，既保证所扩增分子在量上的可检测性，同时也保证了对选择性剪接转录本差异表达进行相对定量分析的可靠性，即三个转录本RT-PCR反应扩增产物之间的比例关系初步反映了所对应转录本之间的表达量的差异。另外，由于转录本*SDIR1-691*、*SDIR1-666*的表达量很低，使用传统的Northern杂交技术很难对其进行定量分析，本实验根据竞争性PCR原理，在挑选一定数量克隆子的基础上用类似竞争性PCR的方法，对*SDIR1*基因进行比例分析可以更灵敏地反映不同的转录本的差异表达量。

〔参 考 文 献〕

Anireddy SN, 2007. Reddy. Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era [J]. *Annual Review of Plant Biology*, **58**: 267—294

Barbazuk WB, Fu Y, Karen M *et al*., 2008. Genome-wide analyses of alternative splicing in plants opportunities and challenges [J]. *Genome Research*, **18**: 1381—1392

Bustin SA, 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, **25**: 169—1931

de la Fuente van Bentem, Vossen JH, Vermeer JE *et al*., 2003. The subcellular localization of plant protein phosphatase 5 isoforms is determined by alternative splicing [J]. *Plant Physiology*, **133**: 702—712

Garcia-Ortiz MV, Ariza RR, Hoffman PD *et al*., 2004. *Arabidopsis thaliana* AtPOLK encodes a DinB-like DNA polymerase that extends mispaired primer termini and is highly expressed in a variety of tissues [J]. *The Plant Journal*, **39**: 84—97

Gilliland G, Perrin S, Bunn HF *et al*., 1990. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantition by competitive polymerase chain reaction [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**: 2725

Gonzále T, Terrón MC, Zapico EJ *et al*., 2003. Use of multiplex reverse transcription-PCR to study the expression of a laccase gene family in a basidiomycetous fungus [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 7083—70901

Hamada S, Ito H, Hiraga S *et al*., 2002. Differential characteristics and subcellular localization of two starch-branching enzyme isoforms encoded by a single gene in *Phaseolus vulgaris* L [J]. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 16538—16546

Iida K, Seki M, Sakurai T *et al*., 2004. Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing in *Arabidopsis thaliana* based on full-length cDNA sequences [J]. *Nucleic Acids Research*, **32**: 5096—5103

Isshiki M, Yamamoto Y, Satoh H *et al*., 2001. Nonsense-mediated decay of mutant waxy mRNA in rice [J]. *Plant Physiology*, **125**: 1388—1395

Kikuchi S, Satoh K, Nagata T *et al*., 2005. Collection, mapping and annotation of over 28000 cDNA clones from japonica rice [J]. *Science*, **301**: 376—379

Kitagawa N, Washio T, Kosugi S *et al*., 2005. Computational analysis suggests that alternative first exons are involved in tissue-specific transcription in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Bioinformatics*, **21**: 1758—1763

Li J, Li X, Guo L *et al*., 2006. A subgroup of MYB transcription factor genes undergoes highly conserved alternative splicing in *Arabidopsis* and rice [J]. *Journal of Experimental Botany*, **57** (6): 1263—1273

Morrison C, Gannon F, 1994. The impact of the PCR plateau phase on quan titative PCR [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1219** (2): 493—498

Reddy ASN, Golovkin M, 2008. Nuclear pre-mRNA Processing in Plants [M]. Berlin: Springer-Verlag, 201—218

Schmucker D, Clemens JC, Shu H *et al*., 2000. Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity [J]. *Cell*, **101**: 671—684

Wang BB, Brendel V, 2006. Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 7175—7180

Werneke JM, Chatfield JM, Ogren WL, 1989. Alternative mRNA splicing generates the two ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activase polypeptides in spinach and *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, **1**: 815—825

Zhang YY, Yang CW, Li Y and etc, 2007. SDIR1 is a ring finger E3 ligase that positively regulates stress-Responsive abscisic acid signaling in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, **19**: 1921—1929

Zhang YY, Li Y, Gao T *et al*., 2008. *Arabidopsis* SDIR1 enhances drought tolerance in crop plants [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **72** (8): 2251—2254

Zhang H, Sreenivasulu N, Weschke W, 2004. Large-scale analysis of the barley transcriptome based on expressed sequenc-etags [J]. *The Plant Journal*, **40**: 276—290

Zhang J, Desai M, Ozanne SE *et al*., 1997. Two variants of quantitative reverse transcriptase PCR used to show differential expression of a-, b-and c-fibrinogen genes in rat liver lobes [J]. *Biochemical Journal*, **321**: 769—7751